

Aus dem II. Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DEN
FOLLIKE-, THEKA- UND INTERSTITIELLEN ZELLEN
JUVENILER RATTENOVARIEN IN DER KULTUR

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der ehem.

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1970

vorgelegt von

Christian Vermehren

aus Kiel

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy S c h w a r z

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den
Follikel-, Theka- und interstitiellen Zellen
juvener Rattenovarien in der Kultur.

Inaugural - Dissertation
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der ehem.
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christian Vermehren
aus Kiel

ehem. Dekan: Professor Dr. med. Herbert Lax
Referent: Professor Dr. med. Hans-Joachim Merker
Korreferent: Professor Dr. med. Willy Schwarz



Gedruckt mit Genehmigung der ehem. Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 11. September 1970

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methode	7
A. Kultivierung und Elektronenmikroskopie	
B. Darstellung der Dehydrogenaseaktivität	
III. Befunde	9
A. Unbehandelte und unkultivierte Kontrollen	9
B. Kultivierungsversuche	11
1. Follikelzellen	
2. Interstitium und Theka	13
C. Histochemische Befunde	16
IV. Diskussion	18
V. Zusammenfassung	25
VI. Literaturverzeichnis	26
VII. Bildanhang	31



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548809_0063

1. Einleitung

Die Morphologie der Ovarien von Säugetieren ist durch lichtmikroskopische, elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen weitgehend bekannt. (Lit. siehe WATZKA, 1957; MERKER und DIAZ, 1969; STEGNER, 1967). Noch nicht in diesem Maße gesichert und sogar teilweise noch umstritten sind aber die Funktionen der einzelnen zellulären Bestandteile des Ovars, sowie ihr Verhalten unter den verschiedensten physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Die Beurteilung der funktionellen Veränderungen und der Lokalisation der verschiedenen Schritte der Hormonsynthese wird aber in vivo außerordentlich erschwert durch die starke Überlappung mit anderen steroidbildenden und -abbauenden Organen. Daneben spielen erschwerend noch nicht völlig überschaubare nervöse Regulationen eine Rolle. Die direkte Wirkung übergeordneter Hormone auf die einzelnen Zelltypen im Ovar und deren funktionelle Möglichkeiten sind deshalb im lebenden Organismus nur sehr schwierig experimentell exakt zu erfassen.

Eine Möglichkeit derartige Untersuchungen durchzuführen ist durch die in vitro-Untersuchung von Geweben gegeben. Hier sind bisher verschiedene Methoden angewendet worden, bei denen zunächst kurzfristige und langfristige Techniken zu unterscheiden sind:

Die kurzfristige Technik benützt die Durchströmung von Organen oder die Untersuchung von Gewebshomogenaten und Partikelfraktionen nach Inkubation in bestimmten Medien. Diese in vitro-Techniken sollen aber nicht berücksichtigt werden. Nur die langfristige Kultivierung von Geweben ist im eigentlichen Sinne als Gewebeskultur zu bezeichnen.

Zur Kultivierung von Geweben stehen eine Fülle von methodischen Möglichkeiten zur Verfügung. Vereinfacht zusammengefaßt können sie eingeteilt werden in folgende drei Möglichkeiten:

1. Deckglaskultur
2. Monolayer-Kultur
3. Organ- oder Stückkultur

Diese Methoden sind bereits früh zur Züchtung von Gonadengewebe benützt worden. So berichten MACCABRUNI (1913), WOLFF und ZONDECK (1925), HJASSOJEDOFF (1925), CHAMPY (1927), TAKEGUTI (1938), LONG (1940), DEMUTH (1941), OLIVO (1934) über die Züchtung von Säugetierovarien in Deckglaskulturen. Monolayer-Kulturen sind aus methodischen Gründen nur wenig berücksichtigt worden (MERKER und DIAZ, 1969; CHANNINGS, 1969 a,b,c; CHANNINGS and GRIEVES, 1969). Stückkulturen benutzte erstmals CHAMPY (1920). In der Folgezeit haben sich vor allen Dingen WOLFF und HAFEN (1965) sowie BOUSQUET (1967) mit dem Problem der Stückkultur von

Ovarien beschäftigt. Erstere beschrieben ihre Erfahrungen in einem zusammenfassenden Artikel. Diese Arbeiten befassen sich aber vorwiegend mit den Problemen der histiotypischen Erkennung der Keimzell-differenzierung und mit dem Einfluß von Hypophysenhormonen auf die Keimzellreifung. Die Fragen der Steroidsynthese und ihrer Lokalisation wurden weniger berücksichtigt. Das beruht auf den Schwierigkeiten der rein morphologisch-lichtmikroskopischen Erkennung und Charakterisierung hormonaktiver Zellen.

Nach der Erarbeitung histochemischer Methoden, die den Nachweis von Enzymen der Steroidsynthese möglich machten, erhielt diese Arbeitsrichtung neue Impulse (Lit. siehe RUBIN et al., 1969; BALOGH, 1964).

Die Deckglas- und Monolayer-Methoden sind aber nur mit Einschränkung zur Bearbeitung der Probleme der Steroidsynthese und ihrer Lokalisation zu verwenden. Bei der Deckglasmethode werden nur die Zellen morphologisch erfaßt, die aus dem Mutterstück auswachsen. Diese Zellen müssen dazu auswandern und mitotische Aktivität zeigen. Funktionelle Aussagen sind deshalb nur noch mit großer Vorsicht zu machen.

Für die Monolayer-Kulturen gelten ähnliche Einschränkungen; hier werden nur isolierte Zellen verwendet. Es gehen also die spezifischen Zellkontakte verloren, die eine wesentliche Voraussetzung für die Differen-

zierung sind. Am geeignetsten erscheinen deshalb die sogenannten Organ- oder Stückkulturen. Durch die methodischen Vorarbeiten von TROWELL (1959) gelang es, eine Technik zur Kultivation von Ovarien oder Ovarstücken zu entwickeln.

CHAPEKAR et al. (1966) modifizierte diese Methode und konnte ihre Reproduzierbarkeit beweisen. Trotz dieser Möglichkeit einer histiotypischen Züchtung von Ovargewebe waren aber Aussagen über die Lokalisationsprobleme der Steroidsynthese und über das Verhalten der einzelnen Zelltypen wegen des schlechten Auflösungsvermögens des Lichtmikroskopes besonders der enzymhistochemischen Befunde nur schwer möglich.

Hier bietet sich die Anwendung des Elektronenmikroskopes an. Durch die Arbeiten der letzten Jahre konnten die morphologischen Kriterien der Steroidsynthese und -sekretion erarbeitet werden (CHRISTENSEN and FAWCETT, 1961; JONES and FAWCETT, 1958; MERKER, 1969; SCHWARZ et al., 1962, 1963). Zur Deutung dieser Befunde sind die biochemischen Ergebnisse Voraussetzung. Die Enzyme, die aus Acetat Steroidhormone aufbauen, sind membrangebunden und sitzen den Membransystemen der Mitochondrien und des glatten endoplasmatischen Retikulums (e.R.) auf. Im Einzelnen konnte festgestellt werden, daß die Schritte vom Acetat bis zum Cholesterin die Enzyme, die den Membranen des glatten e.R. aufsitzen, benötigen. Dagegen ist der Schritt

vom Cholesterin zum Pregnenolon mitochondrienabhängig. Progesteron wird aus Pregnenolon wiederum an den Membranen des glatten e.R. gebildet. Auch für die weiteren Hydroxylierungen sind die Enzyme des glatten e.R. verantwortlich. Beide Zellorganellen zeichnen sich in den Steroidsynthetisierenden Zellen durch eine charakteristische Morphologie aus:

Es handelt sich bei diesen Zellen meist um plumpe Zellformen. Die Organellen der Steroidsynthese sind besonders stark ausgeprägt. In den Mitochondrien findet man neben den Cristae noch Tubuli und Vesikel. Das glatte e.R. hat vesikuläre oder tubuläre Gestalt. Außerdem finden sich in diesen Zellen auffallend viele elektronendichte, lipidhaltige Einschlüsse.

Auf Grund dieser Befundewar es möglich, die Topographie der steroidbildenden Zellen im Ovar darzustellen. Die morphologischen Charakteristika einer Steroidsynthese weisen auf die Thekazellen, die sog. "interstitiellen Zellen" in einiger Entfernung von den Follikeln und die Granulosa-Luteinzellen hin (MERKER, 1969; MERKER und DIAZ, 1969).

Das Follikel-epithel zeigt dagegen keine morphologischen Hinweise einer Steroidsynthese.

Als Grundlage für weitere Untersuchungen sind zweifellos elektronenmikroskopische Untersuchungen der kultivierten Ovarien sehr nützlich, um das Verhalten der

Zellen unter in vitro-Bedingungen und die Lokalisierung der hormonsynthetisierenden Zellen genauer zu erfassen. Über solche Untersuchungen an Follikel-, Theka- und interstitiellen Zellen aus kultivierten juvenilen Rattenovarien soll in der folgenden Arbeit berichtet werden. Über das Verhalten der Eizellen unter diesen Bedingungen wurde bereits an anderer Stelle berichtet (MERKER und ZIMMERMANN, 1970).

II. Material und Methode

A. Kultivierung und Elektronenmikroskopie

Das Material stammt von juvenilen 2-4 Wochen alten Rattenweibchen, die durch Dekapitation getötet wurden. Nach der sofortigen Entnahme der Ovarien und nach ihrer Viertelung erfolgte möglichst schnell die Kultivierung. Vom Zeitpunkt der Tötung des Tieres bis zum Beginn der Kultur vergingen nur einige Minuten.

Als Kultivierungsmethode benutzten wir die von TROWELL (1959), die darauf beruht, Organstücke in der Phasengrenze von Kulturmedium und Luft zu züchten. Dazu wird das Material über Fließpapier auf einer Metalldrahtbrücke befestigt. Der Spiegel der Kulturflüssigkeit wird so eingestellt, daß das Fließpapier gerade von unten benetzt wird. Das Kulturmedium besteht aus der sog. YELP-Mischung mit einem Zusatz von 15 % Kälberserum. Die Kultivationsdauer in einem Sauerstoff-Kohlendioxid-Gemisch (5/95 %) bei 37°C betrug 24,48 oder 72 Stunden.

Zur Fixierung wurde 3%ige gepufferte (0,1 m Phosphatpuffer, pH 7,4) Glutaraldehydlösung benutzt. Nach einer Stunde wurde das Material in Pufferlösung gewaschen und in 1%iger OsO_4 -Lösung (auf pH 7,4 gepuffert) nachfixiert. (1 Stunde). Nach Entwässerung in der aufsteigenden Acetonreihe (50 - 70 - 90 - 95 - 100 % Aceton) folgte die Einbettung in Mikropal (Fa. FERAK Berlin). Die mit dem LKB-Ultratom hergestellten Dünnschnitte wurden kontrastiert mit 1%iger wässriger Uranylacetatlösung und nachkontrastiert mit ge-

sättigter Bleizitratlösung (jeweils 15 Min.).

Die Schnitte wurden mit Siemens Elmiskopen I und Ia untersucht (80 kV) und dabei fotografiert (Blenden 200/50).

Die Primärvergrößerung betrug 1500 - 20000.

B. Darstellung der Dehydrogenasen-Aktivität

Unfixiertes Material wurde im Kryostaten gefroren und dann geschnitten. Anschließend erfolgte mit dem Substrat für 50 Min. bei 37°C die Inkubation. Die Inkubationslösung bestand aus 4,5 mg des Substrates Dehydroepiandrosteron gelöst in 3,5 ml Dimethylformamid (DMF), Phosphatpuffer 0,1 m (pH 7,5). Außerdem gehörten zur Inkubationslösung 10 mg NAD, 5,0 ml KCN (0,3 m/pH 7,5), sowie 3,5 mg Nitroblautetrazolium (NBT) in 3,5 ml DMF gelöst. Der pH wurde mit 0,1 n HCL auf pH 7,5 eingestellt. Nach Filtration wurden die Objektträger mit dieser Lösung inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Material 5 Min. lang mit Aqua dest. gespült und darauf 5 Min. in Baker-Formol fixiert. Nach nochmaliger längerer Spülung mit Aqua dest. wurde das Material mit Glycerin-Gelatine zugedeckt und fotografiert. Eine Enzymaktivität ist erkenntlich am blau-violetten Formazan-Niederschlag.

III. Befunde

Im Folgenden sollen nach der klassischen Einteilung die Follikel ebenfalls in primäre, sekundäre und tertiäre eingeteilt werden. Da es bisher sehr schwierig ist, allein auf Grund zytologischer Kriterien die Eireifung zu bestimmen, liegt der Beurteilung die Morphologie der Follikelzellen zugrunde.

Danach haben die primären Follikel ein einschichtiges Epithel, die sekundären dagegen ein mehrschichtiges, und die tertiären zeigen im lichtmikroskopischen Bild ein cavum folliculi.

A. Unbehandelte und unkultivierte Kontrollen

Trotz der weitgehend fehlenden Sexualhormonausschüttung während der Juvenilphase finden wir neben primären und sekundären Follikeln typische Tertiärfollikel. Im Elektronenmikroskop entsprechen die Follikelzellen der verschiedenen Follikeltypen dem in vielen Veröffentlichungen bereits beschriebenen Bild: Sie enthalten einen großen Kern mit Einstülpungen und einem ausgeprägten Nucleolus. Das Cytoplasma ist gekennzeichnet durch zahlreiche freie Ribosomen und ein gut ausgeprägtes raues ER. Die Zellkontur ist polygonal; unterschiedlich lange und breite Fortsätze kommen vor. Zwischen den Zellen liegen weite Interzellularräume. An den Kontaktstellen laufen die Membranen benachbarter Zellen in einem Abstand von 150 - 200 Å nebeneinander her. Außerdem finden sich zonulae occludentes,

d.h. Kontaktzonen, in deren Bereich der Interzellularraum verschwindet und die äußeren Lamellen der Zellmembran verschmelzen. Über die einzelnen Kontaktverhältnisse und die Feinstrukturen der Eizelle unter in vivo-Bedingungen ist in den Dissertationen von WIRSCHING (1970) und HOLBERG-HOFMANN (1970) berichtet worden.

Die Theka ist gegenüber dem übrigen Bindegewebe gut abzugrenzen. Eine Trennung zwischen Theka interna und Theka externa gelingt allerdings nicht. Die Zellen entsprechen in ihrer Feinstruktur zu einem großen Teil typischen Bindegewebszellen, d.h. sie sind bipolar annähernd zirkulär um die Follikel angeordnet und enthalten neben den üblichen Zellorganellen einige Hohlräume des rauhen e.R.. Daneben kommen aber auch in der Theka juveniler Tiere immer noch einzelne Zellen vor, die plumper sind, mehr Zytoplasma besitzen und tubuläre Mitochondrien, glatte e.R. und elektronendichte Einschlüsse haben.

Das übrige interfollikuläre Bindegewebe zeigt das typische Bild des Interstitiums; allerdings kommen auch hier einzeln oder in Gruppen die bei der Theka bereits beschriebenen plumpen Zellen vor. Die Kapillaren haben ein dünnes bis mittelhohes, auf weiten Strecken kontinuierliches, Endothel. Nur einzelne Poren kommen vor. Eine kontinuierliche Basalmembran ist vorhanden, dagegen nur sehr selten Perizyten.

B. Kultivierungsversuche

Bis zu sechs Stunden nach dem Beginn der Kultur, wobei zwischen Entnahme und Kulturbeginn nur immer wenige Minuten einzusetzen sind, finden sich noch keine elektronenmikroskopisch faßbaren Veränderungen. Dann werden sie deutlicher und nehmen bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt - 72 Stunden nach Beginn der Kultur - laufend zu. In der folgenden Beschreibung sollen deshalb die einzelnen Übergangsstadien nicht berücksichtigt werden, da sie in fließenden Übergängen auftreten und von Fall zu Fall sehr wechselnd ausgeprägt sind. Die Veränderungen nach 72 Stunden geben also am besten die möglichen Abweichungen von der Norm wieder.

Als wesentlicher Befund ist festzuhalten, daß sich die Histiotypie des Ovars nicht ändert. Die einzelnen Gewebe sind also noch gegeneinander abgegrenzt und auch die Follikel werden noch von einer Basalmembran umgeben. Auch die Anordnung innerhalb der Follikel mit mehr oder weniger zentraler Eizelle, der zona pellucida und den peripheren Follikelzellen bleibt erhalten.

1. Follikelzellen:

Das Verhalten der Follikelzellen unter in vitro-Bedingungen ist außerordentlich variabel. Es lassen sich Follikel mit Zellen darstellen, die eine völlig intakte Zellstruktur besitzen. Daneben existieren Follikel, deren Zellen fast vollständig nekrotisch geworden sind. Darüber-

hinaus lassen sich alle Übergangsformen zwischen diesen beiden Extremen darstellen. Eine Beziehung des Erhaltungszustandes zur Reife des Follikels läßt sich nicht aufzeigen. Follikel aller drei Reifungsstadien (primär, sekundär, tertiär) können die erwähnten Veränderungen zeigen. Viele Follikel enthalten aber Zellen, deren Organellen unverändert sind. Allerdings treten vermehrt, teilweise in großer Zahl, elektronendichte Einschlüsse auf. Sie sind vorwiegend rund, etwa $0,2 - 0,3 \mu$ groß und werden von einer Membran begrenzt. Ihr Inhalt besteht aus granulärem Material, in das Membran- und Myelinfragmente eingelagert sein können. Sie entsprechen damit rein morphologisch typischen sekundären Lysosomen. In einer Schnittebene kann eine Follikelzelle in vitro bis zu fünfzehn derartige Körper enthalten. Daneben ist die Feinstruktur der übrigen Zellorganellen nicht verändert.

Auffällig ist das ausgeprägte Vorkommen von Hohlräumen des rauen ER. Daneben kommen typische Mitochondrien vom Crista-Typ vor, die quergestellte Cristae und reichlich Matrix besitzen. Häufig ist ein großer Golgi-Apparat in Hufeisenform mit mehreren flachen Lamellen und einem Hof von Vesikeln und Granula zu beobachten.

Die äußere Form dieser Zellen entspricht weitgehend derjenigen von Zellen aus in vivo-Verhältnissen und soll deshalb hier nicht im einzelnen beschrieben werden. Auch das Kontaktverhalten unterscheidet sich nicht. Vorwiegend

findet man an der Berührungsstelle benachbarter Zellen einen parallelen Verlauf der Membranen in einem Abstand von 200 Å. Es kommen aber auch einzelne Abschnitte vor, in denen dieser Interzellularraum verschwindet und die äußeren Lamellen der Zellmembran zusammenfließen. Diese Kontaktstellen können als zonulae occludentes (tight junction) bezeichnet werden.

2. Interstitium und Theka:

Nach Kultivierung geht die Abgrenzung zwischen dem Thekareich und dem übrigen Interstitium weitgehend verloren. In beiden Gebieten kommen Zellnekrosen vor. Sie sind im elektronenmikroskopischen Bild leicht an der Kernpyknose und an der Fragmentierung des Zytoplasmas zu erkennen. Die Kernpyknose selbst zeichnet sich durch eine dichte Packung chromatinähnlicher Substanzen aus. Mitochondrien und andere Organellen sind geschwollen oder lösen sich auf. Diese nekrotisierenden Zellen kommen entweder vereinzelt und isoliert liegend im gesamten interstitiellen Bereich, oder aber gruppiert in unterschiedlich großen Nekrosearealen vor. Nach einem Aufenthalt von 72 Stunden in der Kultur sind Übergangsformen zwischen morphologisch intakten und nekrotisierenden Zellen nicht mehr darzustellen. Es kommen entweder die beschriebenen deutlich geschädigten Zellen oder aber intakte Zellen vor. Die nicht geschädigten Zellen finden sich ebenfalls locker verteilt und isoliert oder gruppiert. Im Elektronenmikroskop lassen sich drei Typen von Zellen nachweisen, die die morphologischen

Kennzeichen eines ungestörten Stoffwechsels aufweisen, d.h. locker verteiltes Karyoplasma mit deutlich hervorgehobenem Nucleolus, nicht geschwollene Mitochondrien und andere Zellorganellen und eine kontinuierliche Zellmembran.

Der erste Zelltyp entspricht den Fibrozyten. Es handelt sich um bipolare Zellen, die einige Hohlräume des rauhen e.R. enthalten, im übrigen aber eine unauffällige Feinstruktur darbieten. Der Kern ist längsoval und zeigt periphere und auch zentrale Chromatinverdichtungen; ein kleiner Nucleolus ist vorhanden.

Der zweite Zelltyp muß als Histiozyt definiert werden. Die Zellform ist außerordentlich variabel. Die Menge und Ausdehnung des Zytoplasmas übersteigt deutlich die entsprechenden Werte der Fibrozyten. Die Histiozyten sind gekennzeichnet durch eine große Zahl polymorpher Einschlüsse. Die Größe dieser Einschlüsse, die alle eine typische Membranbegrenzung zeigen, schwankt zwischen 0,05 und 0,5 μ . Ihr Inhalt ist ebenfalls sehr veränderlich. Man findet alle Übergänge von fast leeren Einschlüssen, die als Vacuolen bezeichnet werden können, bis zu homogenen stark elektronendichten Granula, in denen trotz hoher Auflösung keine weiteren Einzelheiten darzustellen sind.

Die Mehrzahl der Einschlüsse aber enthält fein- und grobgranuläre homogene und membranartige Bestandteile. In vielen Fällen finden sich auch noch relativ unveränderte

oder in Auflösung begriffene Cytoplasmabestandteile. Die unregelmäßige Zelloberfläche der Histiozyten, die eine große Zahl von Vorwölbungen und Einstülpungen aufweist, läßt keinen Zweifel daran, daß diese Zellen phagocytotisch oder endocytotisch tätig sind. Die beschriebenen Einschlüsse müssen deshalb als Phagolysosomen charakterisiert werden, in denen das aufgenommene Material allmählich abgebaut wird. Das phagocytierte Material besteht aus den zerfallenden nekrotischen Zellen der Umgebung. Die übrigen Zellorganellen dieser Zellart bestehen aus einem gut ausgeprägten Golgi-Apparat, einigen Hohlräumen des glatten und rauhen e.R., ovalen Mitochondrien vom Crista-Typ und zahlreichen kleinen Vesikeln und Granula. Der Kern ist vorwiegend rund und weist häufig einen großen Nucleolus im homogenen aufgelockerten Karyoplasma auf. Die Kernkontur ist meistens glatt, jedoch kommen auch flache oder auch fingerförmige Einstülpungen vor. Die Kontur der Zellen selbst ist - wie bereits beschrieben - außerordentlich unregelmäßig. Wir finden hier zahlreiche Vesikulationsprozesse, die zur Entstehung von pinocytotischen Vesikeln, "coated vesicles" und Phagocytoseeinschlüssen führen.

Die dritte Zellart ist ebenfalls durch eine plumpe Zellform und eine große Menge Cytoplasma charakterisiert. Sie ist im feinstrukturellen Bereich gekennzeichnet durch die große Zahl von Mitochondrien, die einen Durchmesser von 3 μ erreichen können.

Sie gehören nicht zum Crista-Typ, sondern enthalten vorwiegend Tubuli und Vesikel in großer Zahl.

Zwischen diesen intramitochondrialen Membranen liegt eine deutlich darstellbare Matrix. Die dichte Packung der Membranen mit umhüllender Matrix bewirkt bei mittlerer Vergrößerung eine deutliche Heraushebung dieser dichten Mitochondrien aus dem umgebenden Cytoplasma. Neben diesen großen und typischen Mitochondrien finden sich noch zahlreiche Membransysteme des glatten und rauhen e.R., freie Ribosomen und unterschiedlich große homogene elektronendichte Einschlüsse, die als Lipoidtropfen anzusprechen sind. Der Kern ist vorwiegend rund und enthält nur wenige Chromatinverdichtungen, zeigt aber einen ausgeprägten Nucleolus. Der Verlauf der Zellmembran ist bis auf einige plumpe Fortsätze relativ glatt.

Der Vollständigkeit halber soll noch kurz erwähnt werden, daß die Endothelzellen der Gefäße ebenfalls noch gut erhalten sein können. Sie sind nicht mehr so abgeflacht, sondern eher plump und engen dadurch das häufig noch als Rest vorhandene Lumen ein. Vereinzelt sind sogar noch unveränderte Erythrozyten nachweisbar.

C. Histochemische Befunde

Bei der histochemischen Darstellung der Steroiddehydrogenasen lassen sich auch nach der Kultivierung der Ovarstücke positive Ergebnisse aufzeigen. Die Enzymaktivität, erkenntlich am blau-violetten Formazan-Niederschlag, fin-

det sich ausschließlich im interstitiellen Raum. Hier fällt eine zusätzliche Häufung im Thekabereich auf. Die notwendige Verankerung der kleinen Ovarstücke im Lebergewebe ergibt dabei die Möglichkeit, die Dehydrogenase-Aktivität der Leberzellen mit zu beurteilen. Die Befunde zeigen, daß erwartungsgemäß diese Aktivität außerordentlich hoch ist.

IV. Diskussion

Trotz eines Aufenthaltes von 72 Stunden in der Kultur ist die Histiotypie der Ovarstücke voll erhalten. Unter Histiotypie verstehen wir die klare Abgrenzung der einzelnen Gewebsarten voneinander und das Erhaltenbleiben gewebstypischer Merkmale im feinstrukturellen Bereich. Im einzelnen bedeutet das:

1. Die Abgrenzung der Follikel, des Oberflächenepithels, der Blutgefäße und der hilusnahen Nerven vom umgebenden Bindegewebe durch eine Basalmembran.
2. Das Vorhandensein von Membransystemen des rauhen e.R. in den Fibroblasten und von Membranen des glatten e.R. in den hormonproduzierenden Zellen, von phagocytotischen Einschlüssen in den Histiozyten und von typischen Organellen in den Eizellen.

Diese Befunde machen es möglich, auch unter den von uns gewählten in vitro-Bedingungen zu Fragen der Differenzierung und der Zellfunktion Stellung zu nehmen.

Im Hinblick auf unser spezielles Problem bedeutet das also, daß der Versuch einer Lokalisation der Steroidsynthese im kultivierten Ovar berechtigt ist. Gegenüber den in vivo-Verhältnissen sind jedoch einige Unterschiede zu registrieren:

1. Die Zahl der nekrotischen Zellen nimmt deutlich zu.

2. Die Zahl der elektronendichten Einschlüsse in den nicht geschädigten Zellen hat sich deutlich vermehrt. Die Häufigkeit der Nekrosen bei den einzelnen Zelltypen variiert außerordentlich. Das Ausmaß der Schädigung kann sich in einzelnen Versuchsserien bei Follikelzellen und Bindegewebszellen umgekehrt proportional verhalten. Darüberhinaus liegen gut erhaltene Zellen neben vollständig geschädigten Zellen. Lokale Faktoren wie etwa die Diffusionsstrecke oder allgemein gültige Regeln, die für alle Zellen gelten müßten, können deshalb für diese Veränderungen nicht verantwortlich gemacht werden. Offenbar sind auch hier individuelle Funktions-, Sensibilitäts- oder Resistenzeigenschaften der einzelnen Zellen mit verantwortlich. Variationen der Kultivationsbedingungen, z.B. Zusammensetzung des Mediums und der Gasphase haben bisher noch keine sicheren Einsichten ermöglicht.

Leichter zu erklären sind die Ursachen des Auftretens und der Entstehungsmechanismen der elektronendichten Einschlüsse. Die morphologische Ähnlichkeit und der Nachweis der sauren Phosphatase lassen keinen Zweifel, daß es sich bei diesen Körpern um sekundäre Lysosomen handelt (DE DUVE, 1963; NOVIKOFF, 1963).

Ungeklärt ist zunächst dabei die Frage, ob diese sekundäre Lysosomenart als Phago-Lysosomen oder als Cyto-Lysosomen zu betrachten ist. Bei Phago-Lysosomen müßte eine phagocytotische Aufnahme

von Zelltrümmern angenommen werden. Das ist bei den Histiozyten des Interstitiums durchaus wahrscheinlich. Diese Deutung trifft aber sicher nicht zu bei vielen anderen Zellen, besonders bei den Follikelzellen. Hier müssen wir diese Einschlüsse eher als Cyto-Lysosomen identifizieren. Nach der Entnahme des Gewebes und nach dem Einbringen in die Gewebekultur sind die Zellen gezwungen, sich den neuen Bedingungen anzupassen. Theoretische Überlegungen und das morphologische Bild lassen keinen Zweifel, daß diese Bedingungen nicht optimal sind. Es kann deshalb angenommen werden, daß ein Teil der Zellausstattung mit Organellen überflüssig ist. Dazu kommen möglicherweise noch funktionelle Umstellungen. Die nicht mehr benötigten Cytoplasmabestandteile werden in begrenzten Cytoplasmaarealen sequestriert und mit Hilfe lysosomaler Enzyme eingeschmolzen. Diese Cytoplasmasequester in den verschiedenen Stadien der Einschmelzung und des Abbaus entsprechen den dunklen Einschlüssen in unseren Bildern.

Es muß aber bei der Besprechung der Lysosomenentstehung in den Zellen der Kultur darauf hingewiesen werden, daß trotz aller nicht optimalen Bedingungen die Ausbildung von Lysosomen an die Vitalität der Zelle gebunden ist. Sie sind das morphologische Zeichen einer aktiven Anpassung an die veränderten Umweltbedingungen. Das sonst unveränderte Bild der Zelle spricht außerdem dafür, daß die Zelle trotz dieser Umstellung im cytoplasmatischen

Bereich ihre zellspezifischen Funktionen weiter ausübt. Eine sogenannte Ent- und Dedifferenzierung wie sie morphologisch in den klassischen Deckglas- oder Monolayerkulturen vor sich geht, findet sich in der Organkultur nicht. Diese Entdifferenzierung läßt sich erkennen an dem Verlust der meisten membranösen und fibrillären Strukturen des Cytoplasmas und an einem vermehrten Auftreten freier Ribosomen (MERKER, 1964). Ähnliche Vorgänge spielen sich in der von uns benützten Organkultur nicht ab. Es muß deshalb angenommen werden, daß die gegenseitige Beeinflussung der Zellen in einer Organkultur solche Entdifferenzierungsvorgänge verhindert. Das Erhalten-bleiben zelltypischer Merkmale, z.B. rauhes e.R. in den Fibrocyten, glattes e.R. und Vesikel-Mitochondrien in den Steroidproduzierenden Zellen weist auf ein Weiterlaufen verschiedener Zelleistungen hin. Auch diese morphologischen Befunde bestätigen also die mit enzymhistochemischen und histochemische Methoden gemachten Erfahrungen, daß auch in Langzeitkulturen eine Steroidsynthese möglich ist.

Nach den Vorarbeiten der letzten Jahre besteht über die Morphologie steroidsynthetisierender Zellen genügende Klarheit. Kurz zusammengefaßt ist in den Zellen eine Steroidsynthese zu vermuten, die tubulo-vesikuläre Mitochondrien, glattes e.R. und elektronendichte Einschlüsse enthalten. Im normalen Säugetierovar unter in vivo-Verhältnissen sind solche Zellen vorwiegend in der

Theka und im Corpus Luteum nachzuweisen (MERKER, 1969).

Eine führende Rolle der Follikel-epithelzellen bei der Östrogenproduktion wurde deshalb bezweifelt. Zu klären bliebe jedoch die Frage, ob unter in vitro-Verhältnissen diese Lokalisation der steroidproduzierenden Zellen erhalten bleibt. Für die Theka und die interstitiellen Zellen kann das voll bestätigt werden. Über das Verhalten im Corpus Luteum können keine Aussagen gemacht werden, da es bisher nicht gelungen ist, in der Kultur bei den Ovarien juveniler Tiere eine Ovulation zu erzeugen. Die Corpora lutea graviditatis der Ratte sind bisher mit dieser Methodik noch nicht untersucht worden. Vergleichbare Untersuchungen mit anderen Tierarten sprechen aber für das Erhaltenbleiben der Hormonproduktion in den Corpus-Luteum-Zellen auch in Langzeitkulturen (CHANNING, 1969 a,b,c; CHANNING and GRIEVES, 1969). Die hormonproduzierenden Zellen der Theka und des Interstitiums zeigen die typischen bereits mehrfach beschriebenen morphologischen Zeichen einer Steroidproduktion. Auffällig ist aber, daß, im Gegensatz zu den in vivo-Verhältnissen, diese Zellen keine Mitochondrien des gemischten Typs, sondern häufig reine vesikuläre Mitochondrien enthalten. Dieser Unterschied könnte auf Differenzen im chemischen Aufbau der gebildeten Hormone hinweisen. Typischerweise findet man nur in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde rein vesikuläre Mitochondrien (SCHWARZ et al., 1962). Es könnte also auf

Grund dieser morphologischen Untersuchungen postuliert werden, daß in vitro im Ovar ein anderes Enzymspektrum vorhanden ist. Die Bestätigung dieser Vorstellung ist aber nur durch biochemische Untersuchungen möglich. Eine Bestätigung der morphologischen Befunde würde interessante Einblicke in den Regulationsmechanismus dieser Vorgänge ermöglichen.

Neben der Steroidsynthese läuft zweifellos auch die Synthese der Zona pellucida weiter. Nach heftigen Kontroversen besteht im Moment Übereinstimmung, daß für den Aufbau dieser Hüllschicht die Follikelzellen verantwortlich zu machen sind (MERKER, 1961; STEGNER, 1967). Die Zona besteht zu einem großen Teil aus Mucopolysaccharid-Protein-Komplexen. Die Synthese der Mucopolysaccharide erfolgt überwiegend im Hyaloplasma, die Synthese des Proteinanteils im rauhen e.R. und die Kopplung beider Komponenten im Golgi-Apparat. Bei einer weiterlaufenden Synthese des Zona-Materials auch in vitro müßte deshalb das Vorkommen von rauhem e.R. und einem ausgeprägten Golgi-Apparat in den Follikelzellen gefordert werden. Dieses Bild läßt sich tatsächlich darstellen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen läuft also nicht nur eine Steroidsynthese, sondern auch eine Mucopolysaccharid-Protein-Synthese weiter.

Aus diesen Gründen ist es deshalb durchaus berechtigt, das beschriebene Versuchssystem zu biochemischen und weiteren morphologischen Untersuchungen zu benutzen.

Die Bedeutung solcher Untersuchungen für die Eizellreifung konnte bereits genauer dargestellt werden (MERKER und ZIMMERMANN, 1970). Ohne Zweifel sind Verbesserungen an diesem System möglich. Neuere Befunde anderer Autoren weisen z.B. auf die Bedeutung der Sauerstoffspannung und die Nützlichkeit von Rattenserum im Medium hin. Auch für die Testung dieser Probleme scheint dieses Kultursystem brauchbar zu sein.

V Zusammenfassung

Follikel-, Theka- und interstitielle Zellen aus kultiviertem Ovargewebe (Organkulturen nach TROWELL) juveniler Rattenweibchen wurden im Elektronenmikroskop untersucht. Die Histiotypie des Ovars ist nicht verändert. Nach der Kultivation findet man sowohl vollständig nekrotisch gewordene, als auch gänzlich intakte Follikelzellen. In diesen treten vermehrt elektronendichte Einschlüsse auf, die aus einem granulären Material bestehen (Cytolysosomen). Die Feinstruktur der übrigen Zellorganellen ist nicht verändert.

Der Thekabereich läßt sich nach der Kultivation kaum noch gegen das übrige Interstitium abgrenzen. Drei verschiedene Zellarten lassen sich in der Theka und im Interstitium elektronenmikroskopisch nachweisen:

1. Ein fibrocytenähnlicher Zelltyp.
2. Ein Zelltyp, der den Histocyten ähnelt.
3. Ein plumper Zelltyp mit allen morphologischen Zeichen der Steroidsynthese.

Das kultivierte Ovargewebe wurde parallel zur elektronenmikroskopischen Untersuchung auch histochemisch untersucht. Durch Darstellung der Steroid-Dehydrogenasen mit Hilfe des blau-violetten Formazan-Niederschlags läßt sich zeigen, daß eine Enzymaktivität ausschließlich im interstitiellen Raum zu finden ist.

Die Lysosomenentstehung sowie eine Steroidsynthese in Langzeitkulturen werden diskutiert.

VI Literatur

- Balogh, K. A histochemical method for the demonstration of 20 - hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat ovaries. J. Histochem. Cytochem. 12, 670-673 (1964)
- Bousquet, J. Culture organotypique de fragments de testicule de Rat. Action de facteurs hormonaux et nutritionnels. Comptes rendus des seances de la Société de Biologie. 161, (1967)
- Champy, Ch. Sur les cultures d'épithelium germinatif in vitro. C.R. Soc. Biol., Paris. 94, 1082, (1927)
- Channing, C.P. Studies on tissue culture of equine ovarian cell types: pathways of steroid genesis. J. Endocrin. 43, 403-414, (1969).
- Channing, C. P. Studies on tissue culture of equine ovarian cell types: effect of gonadotrophins and stage of cycle on steroid genesis. J. Endocrin. 43, 415-425 (1969)
- Channing, C. P. Tissue culture of equine ovarian cell types: culture methods and morphology. J. Endocrin. 43, 381-390 (1969)

- Channing, C. P. Studies on tissue culture of equine
Grieves, S. A. ovarian cell types: steroidgenesis.
J. Endocrin. 43, 391-402 (1969)
- Christensen, A.K. The fine structure of testicular in-
Fawcett, D. W. terstitial cells in mice.
Am. J. Anat. 118, 551-572 (1966)
- de Duve, C. The lysosome concept.
In "Lysosomes", Ciba Foundation
Symposium 1-3 (1963)
- Demuth, F. Züchtung von Kaninchenovarien in
vitro.
Acta brev. neerl. Physiol. 10, 170
(1941).
- Holberg-Hofmann, H. Elektronenmikroskopische Untersuchun-
gen an den Follikelzellen des Ratten-
ovars.
Dissertation, FU Berlin (1970)
- Jones, A.L. Hypertrophy of the agranular endo-
Fawcett, D. W. plasmic reticulum in hamster liver
induced by phenobarbital.
J. Histochem. Cytochem. 14, 215-
236 (1966)
- Long, J. H. Growth in vitro of ovarian germinal
epithelium.
Contr. Embryol. Carneg. Inst. 28,
89 (1940)
- Maccabruni, F. Sperimenti di cultura in vitro dei
tessuti dell'utero e del ovato di
feto umano.
Ann. Ostet. Ginec. 35, 529 (1913)

- Merker, H.-J. Die Veränderungen der Rattenvagina im Zyklus und unter experimentellen Bedingungen.
Habil.-Schr. FU Berlin (1963)
- Merker, H.-J. Synthese, Wirkung und Abbau der Gestagene im elektronenmikroskopischen Bild.
Handb. exp. Pharmakologie, Bd. XXII/2 "Die Gestagene" (1969)
- Merker, H.-J.
Diaz-Encinas, J. Das elektronenmikroskopische Bild des Ovars juveniler Ratten und Kaninchen nach Stimulierung mit PMS und HCG I. Theka und Stroma (interstitielle Drüse).
Z. f. Zellforsch. 94, 605-623 (1969)
- Merker, H.-J.
Zimmermann, B. Electron microscopic studies on the oocyte-maturation in cultures of juvenile rat ovaries.
Z. Zellforsch. im Druck
- Merker, H.-J. Die Lysosomen, eine neue Zellorganellgruppe.
Berlin. Med. 15, 237-244 (1964)
- Mjassojedoff, S.W. Über in vitro-Kulturen von Eifollikeln der Säugetiere.
Arch. Entw. Mech. Org. 104, 1 (1925)
- Novikoff, M.O. In "Lysosomes", Ciba Foundation Symposium, 36-73 (1963)
- Olivo, M. O. Connettivo cellule della granulosa e nuovo prelevati da ovulo umano et coltivati in vitro.
Arch. Ital. anat. embriol. 33, 718 (1934)

- Rubin, B.L. Ovarian steroid biosynthesis and
Balogh, K. 20 -hydroxysteroid dehydrogenase
 activities.
 Transact. N.Y. Academy Sc. 31, 787-
 802 (1969)
- Schwarz, W. et al. Elektronenmikroskopische Untersuchun-
 gen über die Wirkungen von ACTH und
 Stress auf die Nebennierenrinde der
 Ratte.
 Virchows Arch. Path. Anat. 335,
 165-179 (1962)
- Schwarz, W. et al. Die Wirkung von Metopiron und
 Amphenon B auf die Nebennierenrinde
 der Ratte.
 Virchows Arch. Path. Anat. 337,
 270- (1963)
- Stegner, H.E. Die elektronenmikroskopische Struktur
 der Eizelle.
 Erg. Anat. Entwicklungsgesch. 39,
 Heft 6 (1967)
- Takeguti, H. Über die in vitro-Kulturen des
 Ovarialgewebes von neugeborenen,
 jugendlichen und erwachsenen Kanin-
 chen.
 Takuoka acta med. Abstract. 31,
 16 (1938)
- Trowell, O.A. The culture of mature organs in a
 synthetic medium.
 Exptl. Cell Research 16, 118-147
 (1959)

- Watzka, M. Das Ovarium
In: Handbuch der mikroskopischen
Anatomie des Menschen.
Bd. VII/3 Berlin-Göttingen-Heidelberg,
Springer-Verlag (1957)
- Wirsching, H. Das elektronenmikroskopische Bild
der Eizellreifung.
Dissertation, FU Berlin I. Vorberei-
tung.
- Wolff, Et. Sur une methode de culture d'organes
embryonnaires in vitro.
Texas Rep. Biol. Med. 10, 463
(1952 a)
- Wolff, Et.
Haffen, K. Germ cells and gonads.
In: Cells and Tissues in Culture,
2, 697-743 (1965)
- Wolff, E.K.
Zondeck, B.K. Die Kultur menschlichen Ovarial- und
Amniongewebes.
Virchows Arch. 254, 1 (1925)

VII. Bildanhang

Die folgenden Bilder stammen alle von juvenilen Rattenovarien, die 72 Stunden unter den im Abschnitt "Material und Methode" beschriebenen Standardbedingungen gehalten wurden. Diese methodischen Bemerkungen sollen deshalb bei den einzelnen Bildern nicht mehr erwähnt werden.

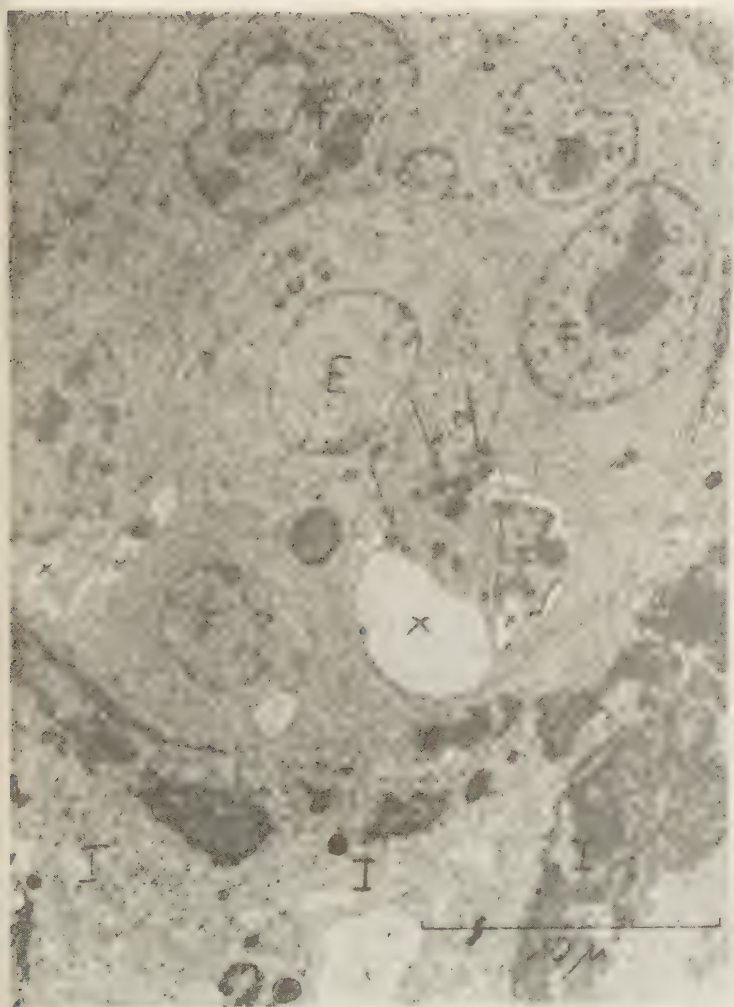


Abb. 1

Später Primärfollikel mit gut erhaltenen Ei- (E) und Follikelzellen (F). Die Struktur des Interstitiums (I) ist weitgehend zerstört. Im Unterschied zum Normalfall kommen in den Follikelzellen einige Vakuolen (x) und vermehrt elektronendichte Einschlüsse vor (•).

Vergr.: 1 : 7000



Abb. 2

Tertiärfollikel mit Eizelle, Zona pellucida (ZP) und Follikelzellen (F). In der Eizelle ein Nucleus (EN) mit dichtem Nucleolus (No) und typischen Membransystemen (x). In den Follikelzellen vermehrt dunkle Einschlüsse ().

Vergr.: 1 : 7000

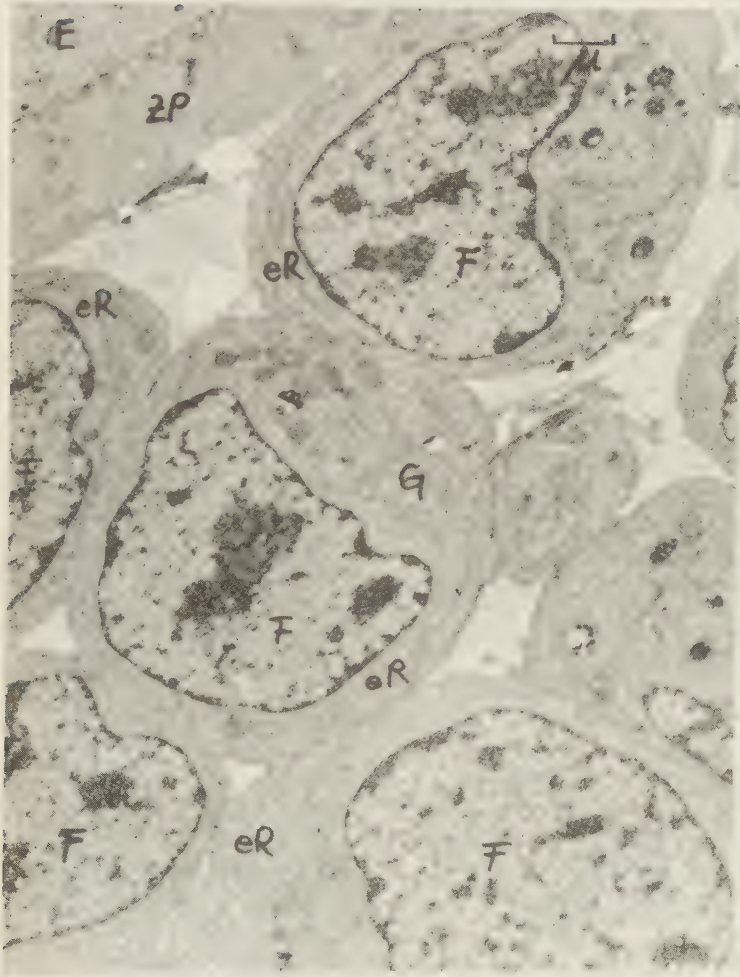


Abb. 3

Tertiärfollikel: Follikelzellen (F) mit deutlich ausgeprägtem rauhen e.R. (eR) und einem großen Golgi-Apparat (G). E = Eizelle, ZP = Zona Pellucida.

Vergr.: 1 : 14 000

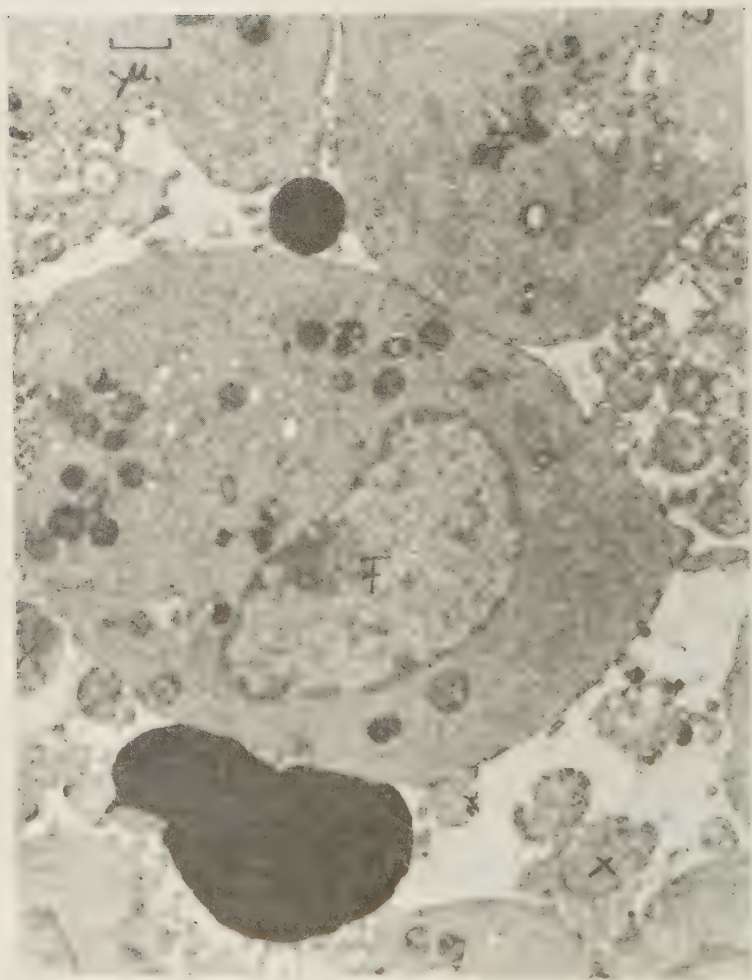


Abb. 4

Tertiärfollikel mit gut erhaltenen Follikelzellen (F) und zahlreichen Zelltrümmern (x).

Vergr.: 1 : 14 000

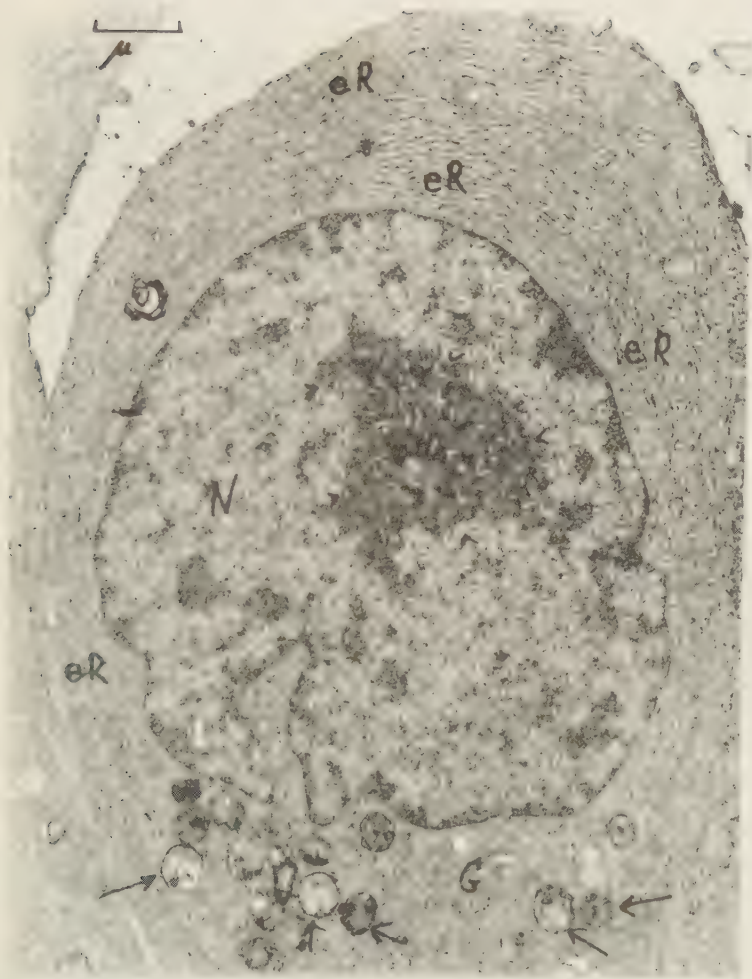


Abb. 5

Follikelzelle aus Tertiärfollikel mit ausgeprägtem rauhen e.R. (eR), Golgi-Apparat (G) und zahlreichen lysosomenähnlichen Einschlüssen (). Im Kern (N) ein großer Nucleolus (No).

Vergr.: 1 : 21 000

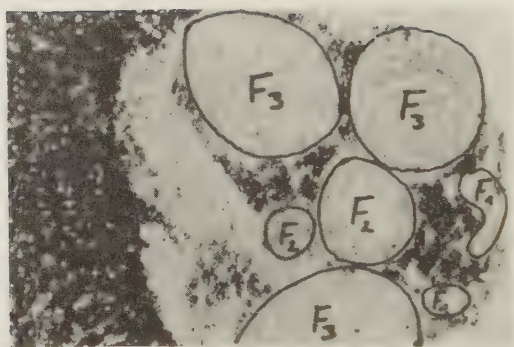


Abb. 6

Lichtmikroskopische Darstellung der Steroiddehydrogenasen. Aktivität zwischen den Primär- (F_1), Sekundär- (F_2) und Tertiärfollikeln (F_3), Im Thekabereich und im interstitiellen Raum. Lebergewebe (L) ebenfalls deutlich positiv.

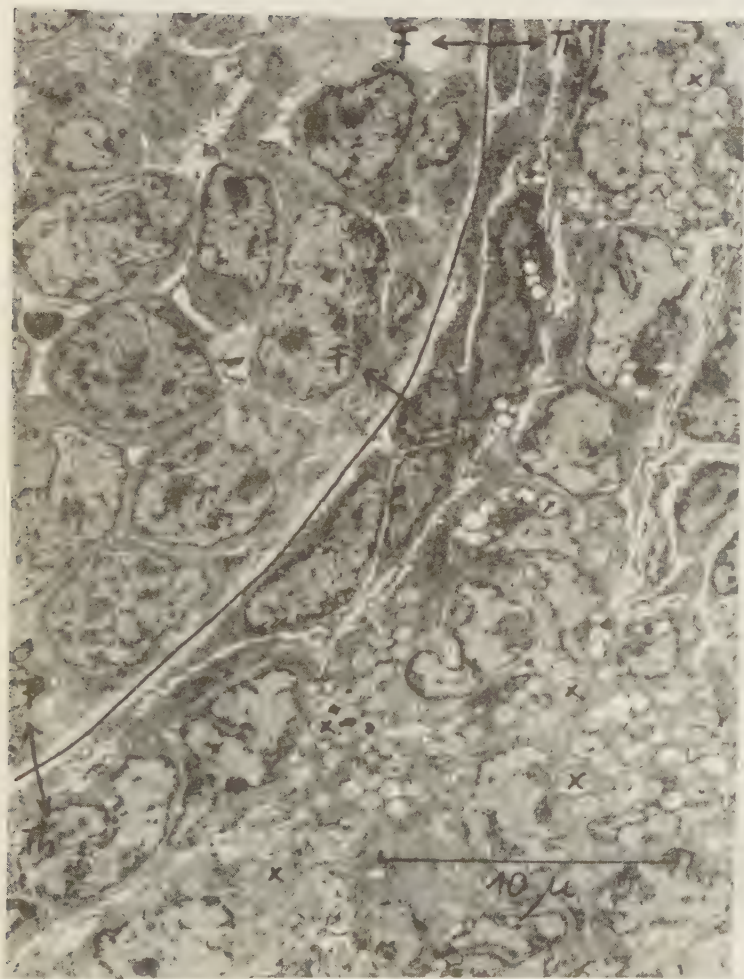


Abb. 7

Randbereiche eines Primärfollikels (F) mit typischen dicht gepackten Thekazellen (Th) mit Fettschlüssen (x).

Vergr.: 1 : 7000

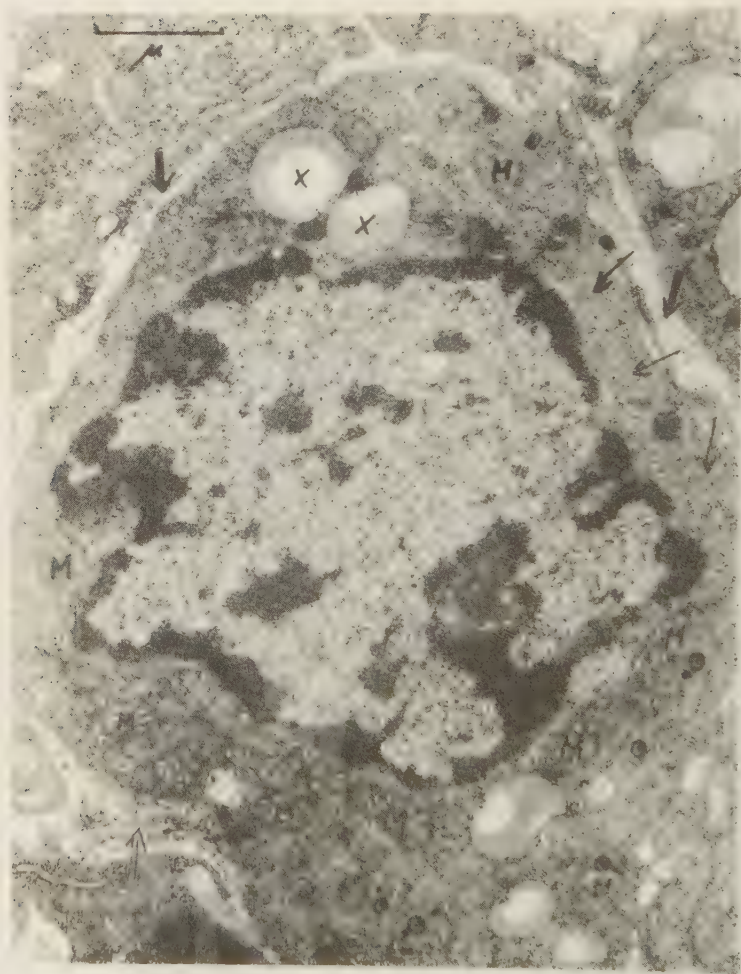


Abb. 8

Interstitielle Zelle mit typischen Mitochondrien (M) vom Tubulus-Typ, die elektronendichte Einschlüsse enthalten (o). Im übrigen Cytoplasma glattes e.R. mit freien Ribosomen (). Im interzellulären Raum kollagene Fibrillen ().

Vergr.: 1 : 30 000

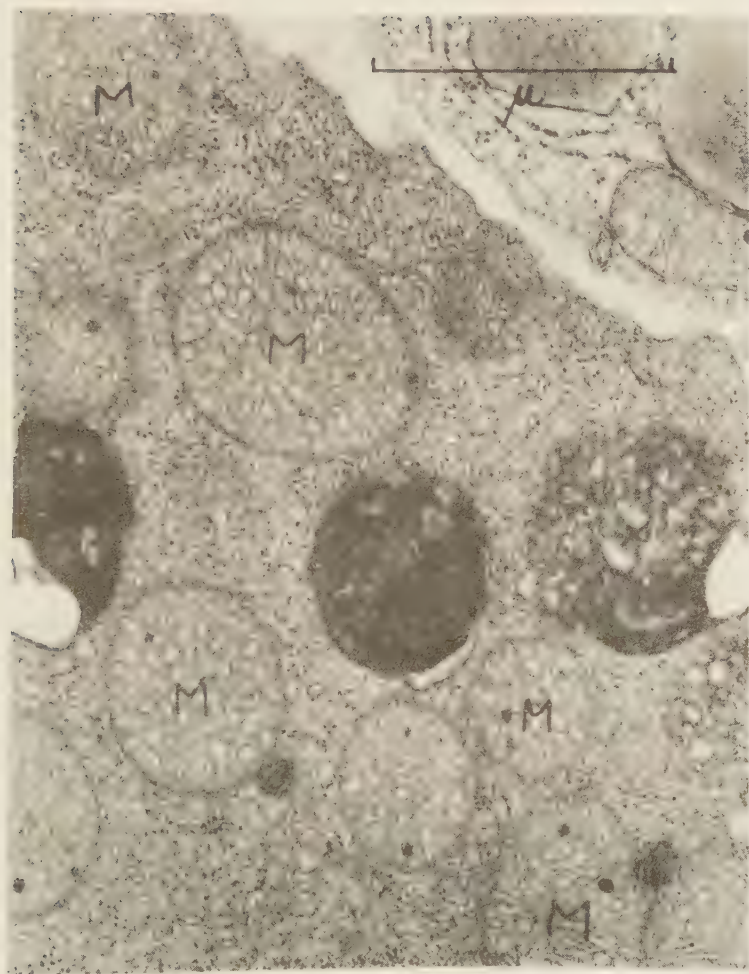


Abb. 9

Teil einer Thekazelle mit typischen elektroneh-
dichten Einschlüsse (x) und Mitochondrien (M)
vom tubulo-vesikulären Typ. Im übrigen Cyto-
plasma freie Ribosomen und glattes e.R.

Vergr.: 1 : 70 000

Lebenslauf

5. März 1941 geboren in Kiel.

Vater: Dr. phil. Hellmut Vermehren.

Mutter: Dr. rer. nat. Beatrice V. geb. Goering.

1948: Einschulung in Berlin-Zehlendorf.

1961: Abitur (Rudolf-Steiner-Schule).

WS 1961/62 Immatrikulation an der FU Berlin.

März 1966 Physikum.

SS 1966 Universität Wien.

WS 1966/67 FU Berlin.

SS 1967 FU Berlin.

WS 1967/68 bis WS 1969/70 Universität Hamburg.

Dezember 1969 Staatsexamen.

